

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20620061152043

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

在重组大肠杆菌和盘基网柄菌中高效表
达可溶性人类 Fas 配体

Production of soluble human Fas ligand by *Escherichia coli* and *Dictyostelium discoideum*

罗 臻

指导教师姓名: 卢 英 华 教 授

专 业 名 称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2 0 0 9 年 5 月

论文答辩日期: 2 0 0 9 年 6 月

学位授予日期: 2 0 0 9 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要.....	I
第一章 文献综述	1
1.1 人类 Fas 配体 (hFasL)	1
1.1.1 hFasL 的分子结构	1
1.1.2 hFasL 的体内分布	2
1.1.3 hFasL 与细胞凋亡	2
1.1.4 hFasL 的作用机理	3
1.1.5 hFasL 的医学价值及应用前景.....	4
1.2 hFasL 的重组生产.....	5
1.2.1 膜结合形式 hFasL 和可溶性形式 hFasL	5
1.2.2 hFasL 重组生产的研究概况	5
1.2.3 原核表达系统——大肠杆菌.....	7
1.2.4 真核表达系统——盘基网柄菌.....	12
1.2.5 基因工程生产 hFasL 存在的问题.....	16
1.3 hFasL 的分离纯化.....	16
1.3.1 分离纯化重组蛋白的特点.....	17
1.3.2 分离纯化重组蛋白的原则.....	17
1.3.3 金属螯合亲和层析.....	17
1.4 本课题内容及研究意义	18
第二章 hFasL 表达载体 pET32a(+)-FasL 的构建.....	20
2.1 材料	20
2.1.1 菌株与质粒.....	20
2.1.2 工具酶及主要试剂.....	20
2.1.3 培养基及常用溶液的配制.....	20
2.1.4 主要仪器设备.....	21
2.2 实验方法	21
2.2.1 重组质粒 pET32a(+)-hFasL 的构建	21
2.2.2 克隆菌株 <i>E. coli</i> DH5 α -pET32a-hFasL 的获得	24
2.2.3 表达菌株 <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET32a-hFasL 的获得.....	25
2.3 结果与分析	26
2.3.1 重组质粒构建.....	26
2.3.2 目的基因 hFasL 的扩增及鉴定.....	27
2.3.3 克隆菌株 <i>E. coli</i> DH5 α -pET32a-hFasL 的鉴定	29
2.3.4 表达菌株 <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET32a-hFasL 的鉴定.....	31
2.4 小结	32
第三章 可溶性 hFasL 在大肠杆菌中的表达及纯化.....	33
3.1 材料	33

3.1.1 菌株.....	33
3.1.2 主要试剂.....	33
3.1.3 培养基及主要溶液的配制.....	33
3.2 实验方法	34
3.2.1 重组大肠杆菌胞内外蛋白的提取.....	34
3.2.2 重组 hFasL 的诱导表达.....	35
3.2.3 表达产物的 SDS-PAGE 电泳检测	36
3.2.4 表达产物的免疫印迹 (Western Blotting) 分析	37
3.2.5 hFasL 浓度的测定	38
3.2.6 目标蛋白的 Ni-NTA 亲和层析	39
3.3 结果与分析	41
3.3.1 重组 hFasL 的可溶性鉴定.....	41
3.3.2 重组 hFasL 最适诱导表达条件的确定.....	42
3.3.3 亲和层析纯化重组 hFasL	46
3.4 小结	48
第四章 可溶性 hFasL 在盘基网柄菌中的分泌表达及纯化.....	49
4.1 材料	49
4.1.1 菌株.....	49
4.1.2 主要试剂.....	50
4.1.3 培养基及主要溶液的配制.....	50
4.2 实验方法	53
4.2.1 重组盘基网柄菌 AX3-FH 的摇瓶培养	53
4.2.2 重组盘基网柄菌 AX3-FH 的间歇发酵	54
4.2.3 细胞密度的测定.....	54
4.2.4 葡萄糖浓度的测定.....	54
4.2.5 发酵液的处理.....	55
4.2.6 目标蛋白的 Ni-NTA 亲和层析	56
4.3 结果与分析	58
4.3.1 重组盘基网柄菌 AX3-FH 的摇瓶培养	58
4.3.2 重组盘基网柄菌 AX3-FH 的间歇发酵	59
4.3.3 亲和层析纯化重组 hFasL	60
4.4 小结	62
第五章 重组可溶性 hFasL 生物学活性的初步检测	64
5.1 材料	64
5.1.1 细胞株.....	64
5.1.2 培养基及主要溶液的配制.....	64
5.2 实验方法	64
5.2.1 细胞培养.....	64
5.2.2 MTT 法最适条件的选择	65
5.2.3 MTT 法检测体外细胞存活率.....	66
5.3 结果与分析	66
5.3.1 MTT 法最适条件的确定	66

5.3.2 重组 hFasL 抑制肿瘤细胞生长的活性检测.....	69
5.4 小结	73
第六章 结论与展望	74
6.1 结论	74
6.2 展望	75
参 考 文 献	76
附 录.....	84
在读期间发表论文	87
致 谢.....	88

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

Abstract.....	I
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Introduction of human Fas ligand (hFasL).....	1
1.1.1 Molecular structure of hFasL.....	1
1.1.2 Distribution of hFasL <i>in vivo</i>	2
1.1.3 hFasL and cell apoptosis.....	3
1.1.4 Function mechanism of hFasL.....	4
1.1.5 Medical applications of hFasL.....	5
1.2 Production of recombinant hFasL.....	5
1.2.1 Membrane-bound hFasL and soluble hFasL.....	5
1.2.2 Studies on recombinant expression of hFasL.....	5
1.2.3 The prokaryotic model system- <i>Escherichia coli</i>	7
1.2.4 The eukaryotic model system- <i>Dictyostelium discoideum</i>	11
1.2.5 Problems of recombinant hFasL production.....	15
1.3 Purification of hFasL.....	17
1.3.1 Characters of recombinant protein purification.....	17
1.3.2 Principles of recombinant protein purification.....	17
1.3.3 Metals-chelating affinity chromatography.....	17
1.4 Contents and purpose of the thesis.....	18
Chapter 2 Construction of recombinant plasmid pET32a(+)-hFasL..	20
2.1 Materials.....	20
2.1.1 Strains and plasmids.....	20
2.1.2 Restriction enzymes and reagents.....	20
2.1.3 Medium and solutions.....	20
2.1.4 Equipment.....	20
2.2 Methods.....	21

2.2.1 Construction of recombinant plasmid.....	21
2.2.2 Construction of recombinant cloning strain.....	24
2.2.3 Construction of recombinant expression strain.....	25
2.3 Results and analysis.....	25
2.3.1 Construction of recombinant plasmid.....	25
2.3.2 PCR amplification of hFasL gene.....	26
2.3.3 Identification of <i>E. coli</i> DH5 α - pET32a-hFasL.....	29
2.3.4 Identification of <i>E. coli</i> BL21(DE3)- pET32a-hFasL.....	31
2.4 Summary.....	32
Chapter 3 Expression and purification of hFasL from <i>E. coli</i>.....	33
3.1 Materials.....	33
3.1.1 Strain.....	33
3.1.2 Reagents.....	33
3.1.3 Medium and solutions.....	33
3.2 Methods.....	34
3.2.1 Preparation of the soluble fraction of intercellular proteins.....	34
3.2.2 Expression of hFasL and optimization of induction conditions.....	35
3.2.3 SDS-PAGE.....	36
3.2.4 Western blotting.....	37
3.2.5 Determination of recombinant hFasL concentration by ELISA.....	38
3.2.6 Affinity chromatography purification.....	39
3.3 Results and analysis.....	41
3.3.1 Determination of recombinant hFasL expressed in the soluble form.....	41
3.3.2 The best induction conditions of protein expression.....	42
3.3.3 Affinity purification of recombinant hFasL.....	46
3.4 Summary.....	48
Chapter 4 Secretory expression and purification of hFasL from <i>D. discoideum</i>.....	49
4.1 Materials.....	50

4.1.1 Strain.....	50
4.1.2 Reagents.....	51
4.1.3 Medium and solutions.....	51
4.2 Methods.....	54
4.2.1 Shake-flask cultivation of recombinant <i>D. discoideum</i> AX3-FH.....	54
4.2.2 Batch-fermation of recombinant <i>D. discoideum</i> AX3-FH.....	54
4.2.3 Determination of cell density.....	55
4.2.4 Determination of glucose concentration.....	55
4.2.5 Preparation of crude proteins.....	56
4.2.6 Affinity chromatography purification.....	57
4.3 Results and analysis.....	58
4.3.1 Shake-flask cultivation.....	58
4.3.2 Batch-fermation.....	69
4.3.3 Affinity purification of recombinant hFasL.....	60
4.4 Summary.....	62
Chapter 5 Studies on cytotoxicity of recombinant hFasLs.....	64
5.1 Materials.....	64
5.1.1 Tumor cell.....	64
5.1.2 Medium and solutions.....	66
5.2 Methods.....	64
5.2.1 Cell cultivation.....	64
5.2.2 Optimization of reaction conditions of MTT.....	65
5.2.3 MTT reduction method.....	66
5.3 Results and analysis.....	66
5.3.1 The best reaction conditions of MTT.....	66
5.3.2 Determination of cytotoxicity of recombinant hFasLs by MTT.....	69
5.4 Summary.....	73
Chapter 6 Conclusions and prospects.....	74
6.1 Research Conclusion.....	74

6.2 Prospects.....	75
References.....	76
Appendix.....	84
Publications during graduate study.....	87
Acknowledgements.....	88

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

人类 Fas 配体 (hFasL) 是一种细胞凋亡因子, 属于肿瘤坏死因子家族, 是死亡蛋白 Fas 的天然受体。它是一种 II 型跨膜糖蛋白, 通过与细胞表面的 Fas 受体结合可引起 Fas 表达阳性的细胞凋亡。由于可以诱导肿瘤细胞凋亡, hFasL 在肿瘤、AIDS、感染性疾病等的治疗中有着广阔的应用前景。

本文分别在原核表达系统大肠杆菌和真核表达系统盘基网柄菌中以可溶性形式实现了 hFasL 的高水平表达。从重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 中提取重组质粒 pMB74-hFasL 作为模板, PCR 成功扩增编码 hFasL 胞外区第 141~281 个氨基酸的基因序列。选用质粒 pET32a(+) 作为原核表达载体 (其上的 TrxA 融合标签可以改善重组蛋白的可溶性), 将 hFasL 基因插入质粒 pET32a(+) 的多克隆位点, 转化大肠杆菌, 成功构建了重组表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)-pET32a-hFasL。测序结果表明, 插入的目的基因大小为 438bp, 经序列比对发现此片段与人类 Fas 配体序列的同源性为 100%, 最终证明重组菌株 *E. coli* BL21(DE3)-pET32a-hFasL 构建成功。将此重组菌株接种至 LB 培养基, 使用 IPTG 作为诱导剂, 通过考察诱导温度、诱导剂浓度和诱导时间等因素, 获得最适诱导条件, 在此条件下 hFasL 表达量可达 1.0 mg L^{-1} 。

采用 10 L 发酵罐, 选用全合成培养基 SIH 发酵培养盘基网柄菌 AX3-FH。间歇培养至 80 h, 菌体密度最大可达 $8.3 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$, hFasL 最高产量为 $420 \mu\text{g L}^{-1}$ 。采用亲和层析 (Ni-NTA) 纯化重组大肠杆菌和重组盘基网柄菌表达的 hFasL, 经鉴定, 目标蛋白纯度分别为 94% 和 90%。采用 MTT 法检测两种不同来源的重组 hFasL 体外诱导肿瘤细胞凋亡的活性, 首先通过考察接种细胞数量、MTT 添加量和反应时间等因素, 确定 MTT 反应的最适条件。在此条件下, 两种重组 hFasL 对人宫颈癌细胞和人肺癌细胞的增殖抑制作用上有着相似的生物学活性, 并且都呈现类似的剂量依赖关系。

关键字: 人类 Fas 配体; 大肠杆菌; 盘基网柄菌; 亲和层析; 凋亡活性

Abstract

Human Fas ligand (hFasL) is a cell apoptosis factor belonging to the tumor necrosis factor (TNF) family. It is a type II membrane protein that induces apoptosis in the Fas-bearing cells. According to its special biological activity, hFasL has the potential therapeutic use as an anti-cancer agent directing at enhancing apoptosis in tumor cells.

In this study *E. coli* and eukaryotic *Dictyostelium discoideum* were used to produce a soluble form of hFasL in large amount. An expression vector for hFasL production in *E. coli* was constructed based on plasmid pET32a(+), whose TrxA Tag improve the recombinant protein to be expressed in the soluble form. DNA encoding the extracellular region of human Fas ligand (amino acids 141-281) was PCR-amplified from plasmid pMB74-hFasL and cloned into pET32a(+). The recombinant plasmid pET32a-hFasL was then transformed into *E. coli* BL21(DE3) for protein expression and checked through DNA sequencing. The sequencing result showed that the recombinant plasmid pET32a-hFasL was successfully constructed. The clone *E. coli* BL21(DE3) harboring the pET32a-hFasL was cultured in shake flasks using LB medium to verify the protein expression. The inducing conditions were optimized including induction temperature, concentration of IPTG and inducing time, and under the best condition a hFasL concentration of 1.0 mg L^{-1} was reached.

D. discoideum stain AX3-FH was cultured in a conventional stirred bioreactor on synthetic SIH medium, and cell densities of up to $8.3 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ and a maximum hFasL concentration of $420 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ were obtained after 80 hours of cultivation. Using Ni-NTA affinity chromatography purification, two kinds of recombinant hFasLs from *E. coli*

and *D. discoideum* were purified with a purity of 94% and 90%, respectively. The cytotoxic activities of recombinant hFasLs were determined by MTT method. MTT reaction conditions including cell density, concentration of MTT reagent and MTT reaction time were optimized. Under the best MTT reaction condition, these two kinds of recombinant hFasLs showed similar biological activities in inducing apoptosis in Pulmonary Carcinoma (A549) and Cervical Carcinoma(Hela) cells.

Key words: Human Fas ligand; *Escherichia coli*; *Dictyostelium discoideum*; Affinity chromatography; Cytotoxic activity

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库